

G. NICOLINI – F. MATTIVI – G. VERSINI

**USO DI GLICOSIDASI ESOGENE IN MOSTI E VINI
ED ATTIVITÀ ENZIMATICHE COLLATERALI**

Estratto da:
«Rivista di Viticoltura e di Enologia»
Anno XLVII – N. 1/ 1994

Uso di glicosidasi esogene in mosti e vini ed attività enzimatiche collaterali

Use of exogenous glycosidases in musts and wines and enzymic side activities

G. Nicolini, F. Mattivi, G. Versini

Istituto Agrario di S. Michele a/A - Via E. Mach, 1 - 38010 S. Michele a/A - Trento - Italia
(ricevuto il 07.01.94, accettato il 27.01.94)

Riassunto

Gli effetti dell'uso, in mosti e vini bianchi e rossi, di sei preparazioni enzimatiche sperimentali e commerciali di dichiarata attività pectolitica e glicosidasi sono stati saggiati relativamente alla presenza di attività collaterali a carico del corredo polifenolico. Sono state riscontrate rilevanti attività esterasiche nei confronti degli esteri cinnamici con liberazione dei corrispondenti acidi in forma libera in quantità elevata (fino a 60 mg/L) ed inusuale.

Quando i trattamenti enzimatici sono stati effettuati sui vini rossi, in diversi casi si sono registrate perdite selettive di antociani in forma libera con riduzione anche notevole dell'intensità colorante ed evoluzione della tinta verso valori numericamente più elevati, tipici di vini meno giovani. Lo stesso comportamento non si è notato nei pochi casi in cui i trattamenti sono stati effettuati sui mosti. Le antocianine p-cumarate sono risultate essere substrato dell'attività collaterale esterasica con formazione di acido p-cumarico libero. La presenza di un composto incognito incolore a scheletro flavonoide di degradazione delle antocianine potrebbe aiutare a spiegare gli incrementi dei dati dei flavonoidi non antocianici talvolta osservati.

Summary

Six experimental and commercial enzymic preparations with pectolytic and glycosidic activities were used in red and white musts or wines. The effects on the polyphenolic content of wines were investigated. Some consequences of esterase side activities on cinnamic esters were found. The content of the free cinnamic acids actually increased, often remarkably up to unusual values (up to 60 mg/L).

When enzymes were used in red wines — but not in red musts — marked and selective losses of free anthocyanins were found in several cases, with great decreasing in colour intensity and corresponding increase of hue towards higher values as for longer aged wines. An effective esterase side activity on p-coumarate anthocyanins causing the formation of free p-coumaric acid was demonstrated by performing the reaction on a pure fraction of anthocyanins in a model wine solution. A new colourless flavonoid compound, whose structure is not yet ascertained, appears as a consequence of the anthocyanins degradation.

Parole chiave: vino, enzimi, glicosidasi, antociani, derivati cinnamici.

Key words: wine, enzymes, glycosidase, anthocyanins, cinnamic derivatives.

Introduzione

L'evoluzione avvenuta negli ultimi anni nel campo della biotecnologia delle preparazioni enzimatiche sta concretizzandosi in sempre maggiori possibilità di pratica applicazione anche nel settore enologico. In particolare un grande interesse esiste attualmente attorno alla possibilità tecnica di liberare per via enzimatica i composti aromatici dai loro precursori glicosidati al fine di esaltare le caratteristiche olfattive dei vini [Grossman et al., 1987; Grossman et Rapp, 1988; Cordonnier et al., 1989; Gunata et al., 1989; Canal Llaubères, 1990; Grossmann et al., 1990; Gunata et al., 1990; Abbott et al., 1991; Bayonove et al., 1992; Nicolini et al., 1993a], caratteristiche che ne costituiscono indiscutibilmente uno dei più importanti aspetti della qualità.

Meno enfatizzate sono invece le informazioni relative alle conseguenze delle possibili attività collaterali che tali preparazioni enzimatiche possono presentare, attività legate al livello di purificazione ed alla specificità di substrato dei singoli enzimi presenti nelle formulazioni sperimentali o commerciali.

Nel presente lavoro si riportano alcune evidenze dell'esistenza delle suddette attività collaterali, con particolare attenzione alle conseguenze sul corredo antocianico e sul complesso dei derivati idrossicinnamici. Gli effetti sul corredo terpenico e quelli sul profilo sensoriale sono già stati oggetto di una specifica nota [Nicolini et al., 1993b].

Materiali e metodi

Nel corso del quadriennio 1990-1993 presso la Cantina di Microvinificazione dell'Istituto Agrario di S. Michele a/A. sono state condotte diverse esperienze di utilizzo di preparazioni enzimatiche ad attività dichiarata pectolitica e glicosidasi, sia sperimentali che commerciali. Tali preparazioni sono state utilizzate su masse omogenee (150 L) di mosti bianchi chiarificati oppure rossi pigiadiraspati; in altri casi il trattamento enzimatico è stato effettuato su minori quantità di vino filtrato sterile, sempre contro un testimone non trattato (T). I trattamenti sui mosti, sia bianchi che rossi, sono stati effettuati concomitantemente all'inoculo dei lieviti selezionati; quelli con la formulazione enzimatica siglata P92 sono stati invece eseguiti al travaso di fine fermentazione su vini di produzione industriale.

Per le varietà rosse la fase di macerazione delle vinacce è durata 7 giorni, alla fine dei quali il vino fiore è stato unito al vino ottenuto dalla pressatura soffice delle vinacce stesse.

Si sono utilizzati i dosaggi consigliati a seconda dei casi dai rivenditori o dai produttori delle formulazioni enzimatiche, le quali verranno da qui in avanti riportate con la seguente segnatura:

R = formulazione pectolitica commerciale, 1990;

C = formulazione pectolitico-cellulasica commerciale, 1990;

P = formulazione sperimentale polverulenta, 1991;

L = formulazione sperimentale liquida, 1991;

P92 = formulazione sperimentale polverulenta, 1992;

P93 = formulazione pectolitico-glicosidasi commerciale polverulenta, 1993.

I composti polifenolici sono stati analizzati secondo le metodiche messe a punto dalla scuola di Asti [Di Stefano et Guidoni, 1989; Di Stefano et al., 1989] secondo le modalità riportate in Mattivi et al., [1991]. Gli indici di Glories [1984] sono stati valutati con le modifiche apportate da Di Stefano e Cravero [1989]. I derivati idrossicinnamici sono stati ana-

lizzati per H.P.L.C. dopo iniezione diretta e rilevazione UV (diode array) a 320nm, applicando i metodi strumentali già riportati in Nicolini et al. [1991]. Gli acidi idrossi cinnamici in forma esterificata sono stati espressi in riferimento ai corrispondenti acidi liberi.

Intensità colorante e tonalità dei vini rossi sono state misurate secondo il metodo usuale riportato nella G.U. CEE L272 del 3 ottobre 1990. Il dosaggio delle singole antocianine libere è stato condotto in H.P.L.C. per iniezione diretta, quantificandole come malvidina-3- monoglucoside e con le condizioni strumentali già riportate [Castia et al., 1992].

Per verificare l'effetto della formulazione P93 sulle antocianine è stato condotto un trattamento (7 giorni, 20° C, 10g/hL) anche su una soluzione sintetica ottenuta nel seguente modo: da un estratto metanolico degli antociani delle bucce di uva della varietà *Merlot* — tramite il passaggio su cartuccia Sep-Pak C 18 nelle condizioni specificate da Piergiovanni et Volonterio [1980] — è stata ottenuta una frazione ricca di antociani esterificati e priva degli acidi cinnamici. L'estratto così purificato è stato portato a secco ed utilizzato per ottenere una soluzione simil-vino a 10 gradi alcoolici, 5 g/L di acido tartarico, pH 3.6 ed antociani 147.9 mg/L.

Risultati e discussione

Variazioni a carico del colore dei vini bianchi

Su 14 partite omogenee di mosti o di vini appartenenti a 7 differenti varietà a bacca bianca sono stati effettuati i diversi trattamenti enzimatici riportati in fig. 1. Nelle tesi enzimatiche emerge una leggera tendenza all'incremento dell'indice dei polifenoli totali e dell'assorbanza a 420nm rispetto alle vinificazioni testimone. Nei casi dei trattamenti sui mosti defecati staticamente a freddo senza l'ausilio di chiarificanti — ed anche per i trattamenti con la formulazione P92 a fine fermentazione — si può ipotizzare che l'attività enzimatica possa essersi espletata sul particolato feccioso più fine, mentre appare abbastanza difficile trovare giustificazioni soddisfacenti per gli incrementi misurati per alcuni dei trattamenti effettuati sui vini filtrati.

Gli incrementi dell'intensità colorante frequentemente riscontrati parrebbero confermare le perplessità parzialmente già espresse [Nicolini et al., 1993a] su possibili imbrunimenti i quali, a nostro avviso, potrebbero essere collegati a fenomeni di autossidazione di alcune frazioni fenoliche posteriormente al trattamento enzimatico. Non sono per altro da escludersi a priori anche imbrunimenti di origine ossidativa come risultato di attività collaterali del trattamento stesso. Le variazioni misurate sono comunque abbastanza limitate e — almeno in buona parte dei casi — di relativa rilevanza tecnologica; alla luce dei dati disponibili la formulazione L sembrerebbe comunque determinare i maggiori incrementi.

Variazioni a carico del colore dei vini rossi

(a) Trattamenti sui mosti

I trattamenti effettuati su mosti rossi in presenza delle vinacce (tab. 1) hanno fatto registrare incrementi del 22-56% per le diverse frazioni polifenoliche in *Moscato rosa*. Andamenti non altrettanto chiari sono emersi per *Teroldego*, nel quale comunque si sono riscontrati aumenti del 14-24% rispettivamente per i parametri polifenoli totali e proantocianidine a basso peso molecolare; una tendenza ad un leggero incremento sembra emergere anche per il contenuto antocianico.

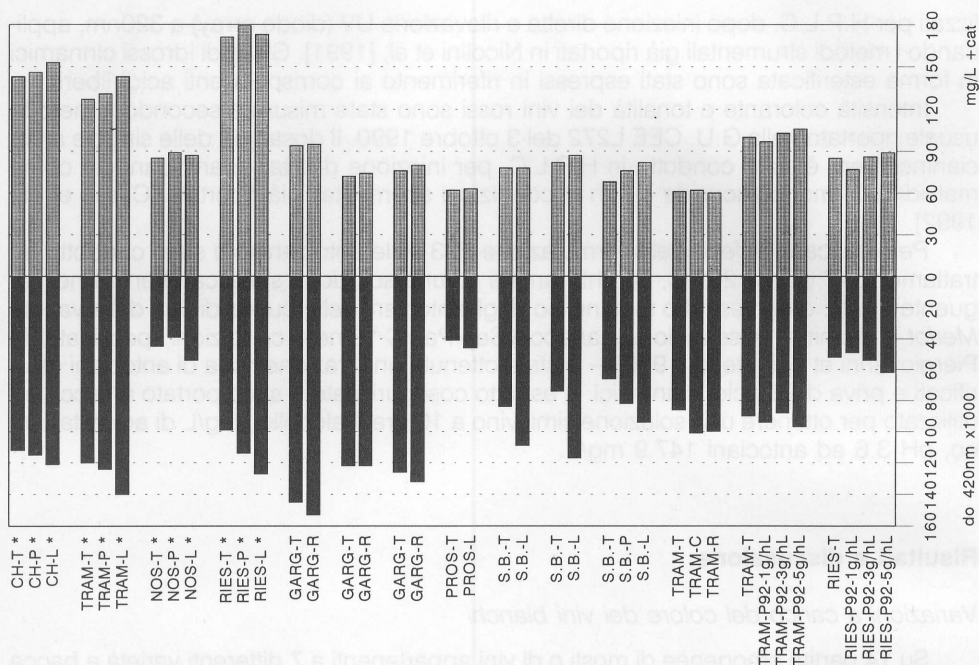


Fig. 1: Polifenoli totali ed assorbanza a 420nm (10mm) nei vini bianchi; enzimaggio sui mosti (*) o sui vini.

Fig. 1: Total polyphenols and adsorbances at 420nm (10mm) in white wines; enzymes used in musts (*) or in wines.

Legenda:

Varietà/Varieties: CH = Chardonnay, TRAM = Traminer aromatico/Gewürztraminer, NOS = Nosiola, RIES = Riesling renano/Rhine Riesling, GARG = Garganega, S.B. = Sauvignon blanc, PROS = Prosecco, M.R. = Moscato rosa/Rose Muscat (varietà rossa/red variety), TER = Teroldego (varietà rossa/red variety), LFF = Lambrusco a foglia frastagliata (varietà rossa/red variety).

Trattamenti/Treatments: T = testimone/test wine, P = enzima in polvere formulazione sperimentale 1991/1991 experimental powder enzyme, L = enzima liquido formulazione sperimentale 1991/1991 experimental liquid enzyme, P92 = enzima in polvere formulazione sperimentale 1992/1992 experimental powder enzyme, P93 = enzima pectolitico-glicosidasi commerciale 1993/1993 commercial powder pectolytic-glycosidase, C = pectolitico-cellulosolitico commerciale 1990/1990 commercial pectinase-cellulase, R = pectolitico commerciale 1990/1990 commercial pectolytic enzyme.

Polifenoli/Phenolics (mg/L): ANT.LIB. = antociani liberi, malv./free anthocyanins; ANT.TOT. = antociani totali, malv./total anthocyanins; ANT.ACIL. = antociani acetilati, malv./anthocyanins (acetic esters); ANT.PCUM. = antociani p-cumarati, malv./anthocyanins (p-coumaric esters); PF.TOT. = polifenoli totali, (+) cat./total polyphenols; PROANTOC. = proantocianidine totali, cian./total proanthocyanidins; VANILL. = proantocianidine reattive alla vanillina, (+) cat./proanthocyanidins react. vanillin; FLAV.NON ANTOC. = flavonoidi non antocianici (+) cat.

Caratteristiche cromatiche/Colour characteristics: I.C. = Intensità colorante/colour intensity, o.d. 420 + 520 + 620 nm, 10 mm; TINTA = hue, o.d. 420 nm/520 nm; dAL% = contributo % alla do 520 nm dato dagli antociani liberi/% of o.d. 520 nm related to free anthocyanins; dTA% = idem dagli antociani decolorabili da SO₂/idem to anthocyanins decolorable by SO₂; dTAT% = idem dagli antociani non decolorabili da SO₂/idem to anthocyanins undecolorable by SO₂.

Tabella 1: Polifenoli e caratteristiche del colore nei vini rossi 1981; enzimaggio sui mosti (Legenda: vedi fig. 1).

Table 1: Phenolics and colour characteristics in the 1991 red wines; enzymes used in the musts (Legenda: see fig. 1).

VINO	PF. TOT. mg/L + cat.	VANILL. mg/L + cat.	ANT. TOT. mg/L malv.	ANT. LIB. mg/L malv.	I.C.	TINTA
M.R.-T	1370	760	246	121	5.19	0.732
M.R.-P	1711	1086	279	131	7.00	0.703
M.R.-L	1725	1185	300	127	7.35	0.689
TER.-T	1296	574	846	452	9.90	0.589
TER.-P	1361	672	745	442	9.34	0.613
TER.-L	1473	709	907	498	11.68	0.597

(b) Trattamenti sui vini

I trattamenti effettuati su 6 diverse masse di vino di differente età e di tre varietà (tab. 2) hanno fatto invece registrare variazioni nel contenuto polifenolico di verso diametralmente opposto a quello dei trattamenti sui mosti. Il dato che emerge su tutti, anche per la pratica rilevanza che riveste, è quello degli antociani che hanno mostrato pesanti variazioni negative imputabili principalmente alle rilevanti perdite (fino al 90%) delle forme libere. Al di là di tali variazioni a carico degli antociani, comunque, il quadro polifenolico non sembra modificato né in modo marcato né univoco tra le diverse tesi.

Tabella 2: Corredo polifenolico (mg/L) dei vini rossi; enzimaggio sui vini ed analisi dopo due mesi dal trattamento (Legenda: vedi fig. 1; x2 = doppia dose; ° = analisi dopo un anno dal trattamento enzimatico).

Table 2: Polyphenolic content (mg/L) of the red wines; enzymic treatments in the wines and analyses two months later. (Legenda: see fig. 1; x2 = double dose; ° = analysis one year later).

VINO wine	ANT. LIB.	ANT. TOT.	PF. TOT.	PRO ANTOC.	VANILL.
M.R.-T	60	166	1226	1174	444
M.R.-L	43	149	1201	1192	419
M.R.-L x2	26	130	1209	1197	432
TER ₁ .-T	226	483	1117	1174	366
TER ₁ .-L	32	231	1134	1232	416
TER ₁ .-L x2	20	176	1137	1267	433
LFF ₁ .-T	120	210	660	660	182
LFF ₁ .-L	49	113	669	573	180
LFF ₁ .-L x2	16	78	660	567	195
LFF ₂ .-T	189	333	1467	1191	769
LFF ₂ .-L	50	202	1424	1168	742
LFF ₂ .-L x2	48	164	1376	1197	754
LFF ₃ .-T °	41	140	598	424	113
LFF ₃ .-P °	23	61	489	356	127
LFF ₃ .-L °	23	61	416	271	100
LFF ₃ .-R °	14	43	364	281	84
TER ₂ .-T °	181	429	1221	1296	437
TER ₂ .-L °	147	415	1200	1196	444

Le variazioni più rilevanti a livello delle frazioni tanniche, espresse attraverso la misura delle proantocianidine totali, si sono registrate in uno dei vini della varietà *Lambrusco a foglia frastagliata* (LFF₃). In tale vino — caratterizzato tra l'altro dal quadro polifenolico quantitativamente più povero tra quelli presenti in tab. 2 — ci sono state riduzioni anche del 34-36%, com'è nel caso rispettivamente della tesi trattata con la formulazione commerciale R ed in quello della formulazione sperimentale L.

L'attività enzimatica si è esplicitata piuttosto rapidamente sia nel caso di vini enzimati dopo un anno dall'imbottigliamento (MR, TER₁, LFF₁) — ossia in un contesto polifenolico già ragionevolmente stabilizzato — che nel caso di vini giovani (LFF₂) se si pensa che già dopo circa una decina di giorni a 15° C erano ben percepibili all'occhio le differenze di intensità colorante e le precipitazioni colorate indotte dai trattamenti. I vini siglati LFF₃ e TER₂ — a differenza degli altri che sono stati analizzati a due mesi dal trattamento enzimatico — sono stati oggetto di analisi 12 mesi dopo il trattamento. Essi non sembrano evidenziare comportamenti diversi ed ulteriori evoluzioni rispetto a quelli già segnalati.

Il calo dei contenuti antocianici si è ripercosso in modo conseguente sulle caratteristiche cromatiche dei vini rossi (tab. 3). Con l'eccezione del *Teroldego* TER₂, l'intensità colorante dei vini enzimati ha subito delle diminuzioni anche molto consistenti e tali da portare, nel caso del *Lambrusco* LFF₃, a valori quasi da vino rosato. La tonalità si è spostata di conseguenza verso valori numericamente più elevati — corrispondenti a colora-

Tabella 3: Caratteristiche cromatiche ed indici di Glories dei vini rossi; enzimaggio sui vini ed analisi dopo due mesi dal trattamento (Legenda: vedi fig. 1; x2 = doppiadose; ° = analisi dopo un anno dal trattamento enzimatico).

Tab. 3: *Colour characteristics and Glories' indexes in the red wines; enzymic treatments in the wines and analyses two months later (Legenda: as in fig. 1; x2 = double dose; ° = analysis one year later).*

VINO wine	d.o. 520 nm	I.C. * * *	TINTA hue	dAL	dTA	dTAT	dAL %	dTA %	dTAT %
M.R.-T	2.31	4.72	0.853	0.23	1.24	0.84	10.0	53.6	36.4
M.R.-L	2.15	4.47	0.888	0.13	1.07	0.95	6.2	49.6	44.2
M.R.-L x2	2.05	4.36	0.932	0.07	1.11	0.87	3.4	54.0	42.6
TER ₁ -T	4.45	8.89	0.739	0.84	2.01	1.60	18.9	45.2	35.9
TER ₁ -L	3.30	7.03	0.848	0.07	1.72	1.51	2.1	52.1	45.8
TER ₁ -L x2	3.04	6.64	0.895	0.04	1.55	1.44	1.4	51.1	47.5
LFF ₁ -T	2.12	4.18	0.811	0.45	1.05	0.62	21.1	49.7	29.2
LFF ₁ -L	1.44	3.20	1.042	0.13	0.73	0.58	9.0	51.0	40.0
LFF ₁ -L x2	1.19	2.82	1.176	0.04	0.58	0.57	3.6	48.9	47.5
LFF ₂ -T	3.32	6.40	0.770	0.61	1.99	0.72	18.3	60.0	21.7
LFF ₂ -L	2.41	5.30	1.004	0.11	1.59	0.71	4.7	66.0	29.3
LFF ₂ -L x2	2.09	4.77	1.081	0.11	1.24	0.69	5.5	61.7	32.8
LFF ₃ -T °	2.55	5.12	0.776	0.15	1.35	1.05	5.9	52.9	41.2
LFF ₃ -P °	0.76	1.81	1.171	0.06	0.30	0.40	8.3	39.1	52.6
LFF ₃ -L °	0.84	1.92	1.060	0.08	0.40	0.36	9.9	47.2	42.9
LFF ₃ -R °	0.59	1.48	1.233	0.04	0.24	0.31	7.3	40.7	52.0
TER ₂ -T °	4.36	9.85	0.764	0.58	2.13	1.65	13.3	48.9	37.8
TER ₂ -L °	5.00	10.22	0.780	0.47	2.41	2.12	9.3	48.3	42.4

zioni meno vivaci e più tendenti al mattone rispetto ai vini testimone – così come accade normalmente per il colore dei vini a stadio evolutivo più avanzato.

Il calo degli antociani liberi ha fatto sì che il colore rosso residuo, misurato a 520nm, abbia un aumentato apporto percentuale delle frazioni antocianiche combinate con i tan-nini (dTAT%, dTAT%), similmente a quanto avviene nel corso dell'invecchiamento. Gli indici di Glories, espressione dello stato di combinazione del colore, in alcuni casi hanno evidenziato perdite concomitanti anche di parte delle frazioni antocianiche combinate (dTAT, dTAT), specialmente in LFF₃.

L'insieme degli indesiderati effetti collaterali sul quadro polifenolico qui evidenziati ci inducono a guardare con occhio critico all'impiego degli attuali preparati enzimatici quando il trattamento sia effettuato a livello di vini rossi.

Variazioni a carico dei derivati cinnamici

(a) Trattamenti sui mosti

L'attività enzimatica si è manifestata con importanti incrementi degli acidi in forma libera (fig. 2) – in particolare caffeico e p-cumarico – che spesso sopraggiungono le for-

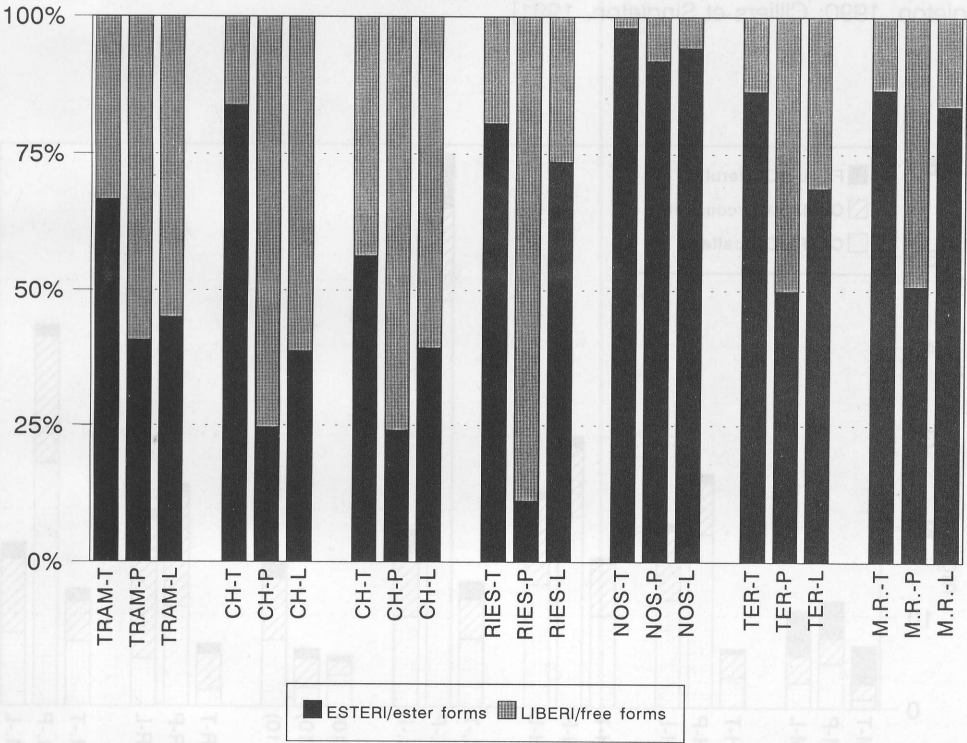


Fig. 2: Ripartizione percentuale dei derivati cinnamici nei vini; trattamento enzimatico sui mosti (Legenda: vedi fig. 1; ESTERI = ac. caftarico + ac. cutaricoglucoside + ac. cutarico + 2-S-glutathionil-caftarico (G.R.P.) + ac. fertarico; LIBERI = ac. caffeico + ac. p-cumarico + ac.ferulico).

Fig. 2: Percentage of ester forms and free acids on the total cinnamic derivatives of wines; enzymic treatment in musts (Legenda: see fig. 1; Ester forms = caftaric ac. + glucoside coutaric ac. + coutaric ac. + 2-S-glutathionylcaftaric ac. (G.R.P.) + fertaric ac.; free forms = caffeic ac. + p-coumaric ac. + ferulic ac.).

me esterificate. I contenuti assoluti (fig. 3) rilevati dopo il trattamento enzimatico in *Riesling renano* (60.95 mg/L) ed in *Moscato rosa* (42.15 mg/L) sono decisamente più elevati dei valori solitamente riportati in bibliografia [Castino et Di Stefano, 1976; Gomez-Cordoves et Gil, 1984; Cheynier et al., 1986; Di Stefano et Garcia-Moruno, 1986; Somers et al., 1987; Nicolini et al., 1991].

Nel caso specifico delle due preparazioni enzimatiche di figg. 2-3 l'enzima P ha mostrato un'attività esterasica su caftarico e p-cutarico più marcata che su fertarico, arrivando ad idrolizzare — per il 50% nei rossi e quasi completamente nei bianchi — i due esteri tartarici. L'enzima L sembrerebbe avere minor attività esterasica, ma maggiore glicosidasi, rispetto a P [Nicolini et al., 1993a].

Queste attività idrolitiche collaterali — per altro già evidenziate fin dal 1976 da Castino e Di Stefano [op.cit.] in formulazioni pectolitiche commerciali — possono comportare importanti, e per lo più non positive, conseguenze chimico-sensoriali. Gli acidi p-cumarico e ferulico liberi costituiscono infatti substrato per la produzione di fenoli volatili da parte dei lieviti [Albagnac, 1975; Dubourdiou et al., 1989; Chatonnet et al., 1992; Grando et al., 1993] — con risultati sensorialmente positivi solo limitatamente a specifici vini [Versini, 1985; Aurich et al., 1987] — mentre l'acido caffeico può determinare una maggiore suscettibilità all'imbrunimento auto-ossidativo durante l'invecchiamento [Cilliers et Singleton, 1990; Cilliers et Singleton, 1991].

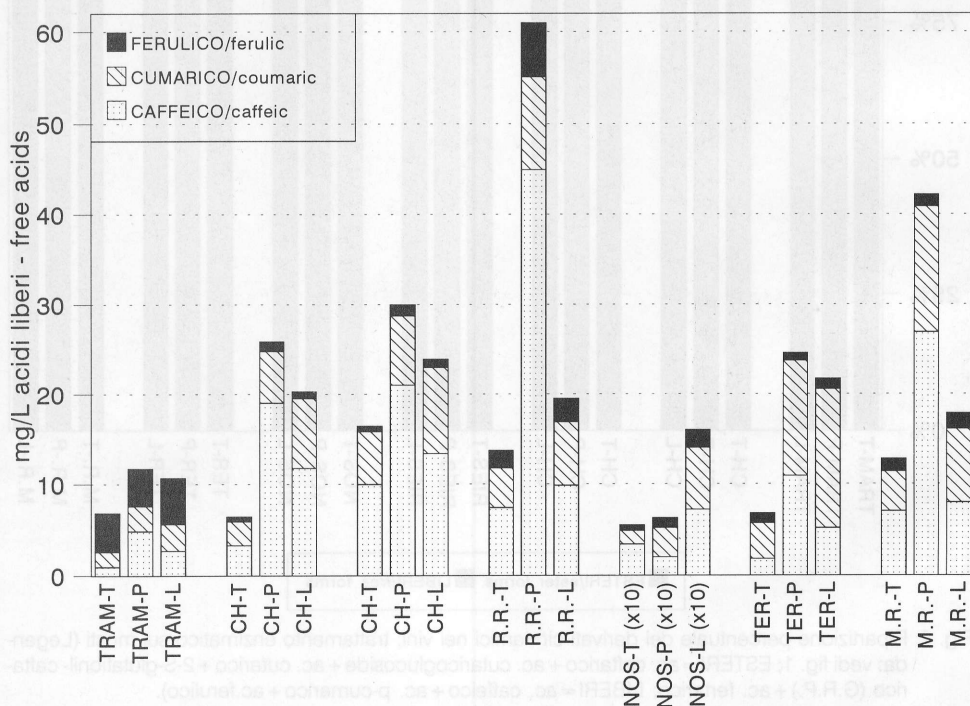


Fig. 3: Contenuto di acidi cinnamici liberi (mg/L) nei vini; trattamento enzimatico sui mosti (Legenda: vedi fig. 1).

Fig. 3: Content of free cinnamic acids (mg/L) in wines; enzymic treatment in musts (Legenda: see fig. 1).

(b) Trattamenti sui vini

Gli incrementi dei singoli acidi liberi nel caso del trattamento dei vini (fig. 4) non contraddicono in linea generale quanto già rilevato per i trattamenti sui mosti. Tuttavia nei vini delle varietà bianche *Garganega* e *Prosecco* l'attività delle formulazioni enzimatiche provate si è manifestata in modo molto più limitato. Va fatto rilevare comunque che i vini testimone delle varietà in questione si caratterizzavano per i più bassi contenuti (-3-6 mg/L) di derivati cinnamici totali tra quelli di tutti i vini analizzati nel presente lavoro. Nel caso del *Traminer* (fig. 4), anch'esso su contenuti piuttosto bassi, si può osservare come già il vino testimone avesse una quota di acidi in forma libera superiore al 53% e che valori elevati di tali frazioni (45%) si erano registrati anche nel *Traminer* testimone di fig. 5. Tali percentuali sono ancor maggiori di quelle già elevate (38-32%) riportate da Grando et al. [1993] sempre per la stessa varietà. Valori elevati e non usuali di acidi liberi in termini percentuali (43%), su valori assoluti delle forme libere di 16.5 mg/L, erano stati registrati anche per la vinificazione testimone di uno dei due *Chardonnay* di fig. 2.

Praticamente nulla è risultata invece l'attività dell'enzima L a carico dei derivati cinnamici nel caso del vino rosso della varietà *Teroldego* (fig. 4). Tale enzima, tra i due provati a livello di mosto (figg. 2-3), aveva già mostrato una minor attività sia – seppur in modo limitato – su una differente massa della stessa varietà *Teroldego* sia – in modo più evidente – nel caso del *Moscato rosa*.

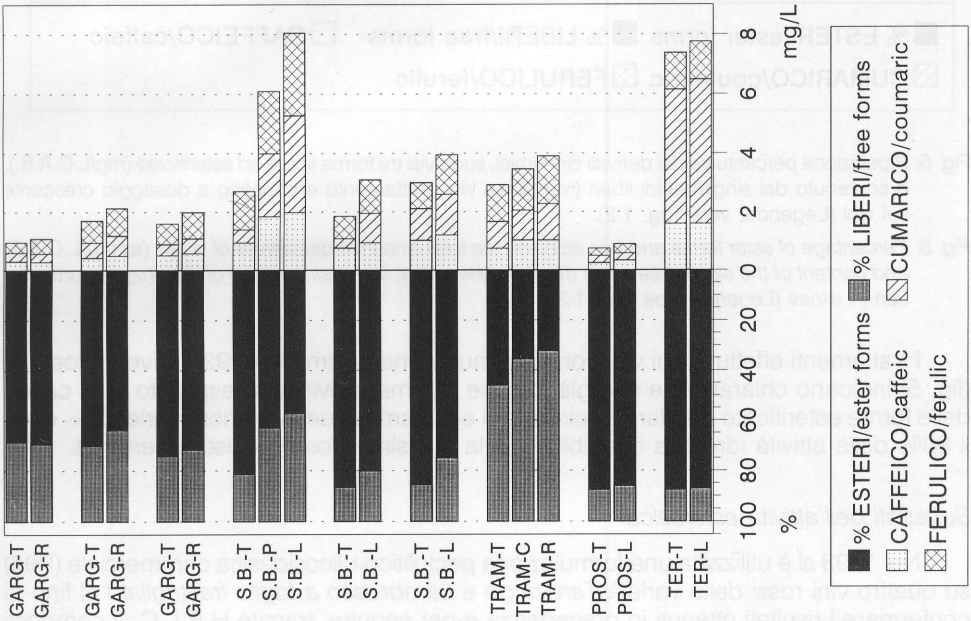


Fig. 4: Ripartizione percentuale dei derivati cinnamici, suddivisi tra forme libere ed esterificate (mg/L C.A.E.), e contenuto di singoli acidi liberi (mg/L) nei vini; trattamento enzimatico sui vini. (Legenda: vedi figg. 1-2).

Fig. 4: Percentage of ester forms and free acids on the total cinnamic derivatives of wines (as mg/L C.A.E) and content of the single free acids (mg/L) in the wines; enzymic treatment in wines. (Legenda: see figg. 1-2).

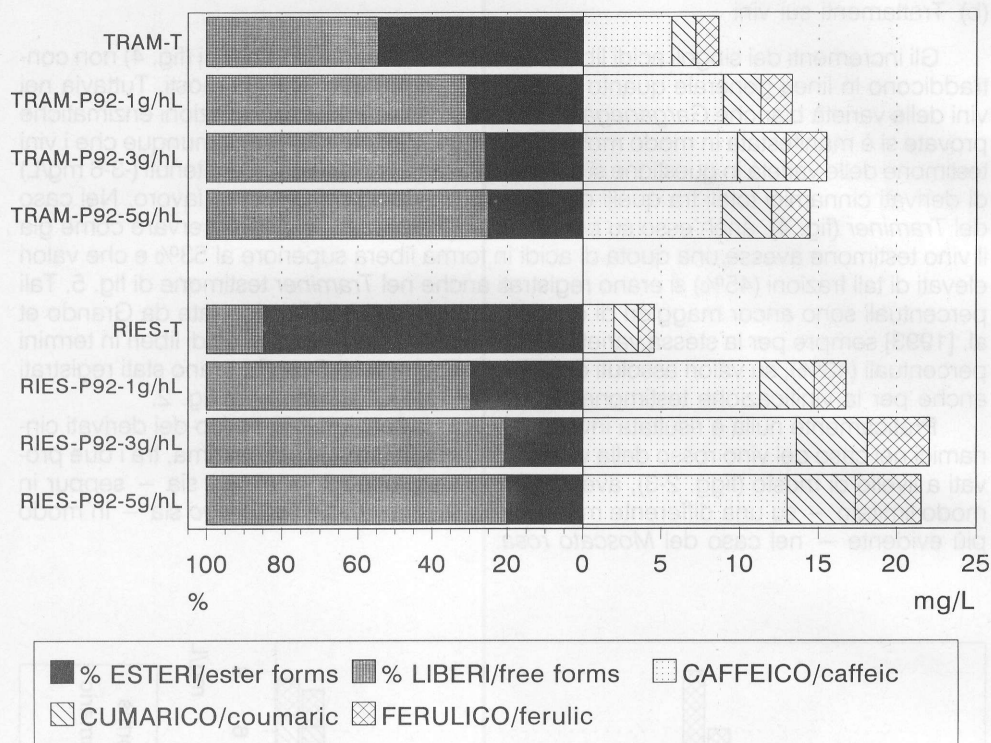


Fig. 5: Ripartizione percentuale dei derivati cinnamici, suddivisi tra forme libere ed esterificate (mg/L C.A.E.), e contenuto dei singoli acidi liberi (mg/L) nei vini; trattamento enzimatico a dosaggio crescente sui vini (Legenda: vedi figg. 1-2).

Fig. 5: Percentage of ester forms and free acids on the total cinnamic derivatives of wines (as mg/L C.A.E.) and content of the single free acids (mg/L) in the wines; increasing doses of the enzymic preparation in wines (Legenda: see figg. 1-2).

I trattamenti effettuati sui vini con la formulazione enzimatica P92 a diversi dosaggi (fig. 5) indicano chiaramente che già la dose minima prevista ha esplicato — a carico delle forme esterificate dei derivati cinnamici ed in ambedue i vini monovarietali — circa il 90% della attività idrolitica ottenibile con la massima dose prevista di enzima.

Substrati dell'attività esterasica

Nel 1993 si è utilizzata una formulazione pectolitico-glicosidasi commerciale (P93) su quattro vini rossi delle varietà *Teroldego* e *Lambrusco a foglia frastagliata* al fine di confermare i risultati ottenuti in precedenza e per seguire, tramite H.P.L.C., i composti fenolici monomerici principali (antocianine ed acidi cinnamici). I risultati, riportati in tab. 4, confermano il generale abbattimento di tutte le forme antocianiche libere e la liberazione degli acidi cinnamici dai loro corrispondenti esteri tartarici. Più in dettaglio, si osserva la scomparsa totale delle antocianine p-cumarate, contro un minore benché fortissimo calo delle antocianine acetilate e libere.

Osservando il bilancio degli acidi cinnamici si vede che parallelamente alla scomparsa degli esteri tartarici si manifesta la formazione delle forme libere; nel caso dell'aci-

Tab. 4: Corredo polifenolico (mg/L) di vini rossi trattati con differenti dosi della preparazione pectolitico-glicosidica P93 (Legenda: vedi fig. 1; SOL. SINT. = soluzione sintetica simil vino).

Tab. 4 Polyphenolic content (mg/L) in red wines treated with different doses of the pectolitic-glycosidase see fig. 1; SOL. SINT. = like-wine synthetic solution)											
VINI wines	FLAV. NON ANTOC.	Σ ANT. LIB.	Σ ANT. ACIL.	Σ ANT. PCUM.	ACIDO CAFFEICO caffeic acid		ACIDO p-CUMARICO p-coumaric acid		ACIDO FERULICO ferulic acid		
					Σ LEGATO Σ bound	LIBERO free	Σ LEGATO Σ bound	LIBERO free	Σ LEGATO Σ bound	LIBERO free	
LFF ₄ test	1191	59.23	3.72	1.82	40.47	4.00	12.00	4.07	2.13	1.14	
LFF ₄ 5 g/hL	1236	22.12	0.92	0.00	11.36	18.57	5.20	11.89	1.66	0.74	
LFF ₄ 10 g/hL	1265	11.05	0.51	0.00	3.78	27.03	5.27	13.40	1.74	1.11	
LFF ₅ test	1232	41.08	2.76	1.44	42.48	3.39	11.93	2.46	2.05	1.05	
LFF ₅ 5 g/hL	1269	22.67	1.33	0.00	16.63	16.70	4.94	11.71	1.87	0.66	
LFF ₅ 10 g/hL	1290	13.12	0.63	0.00	6.01	24.23	4.53	13.31	1.89	0.86	
TER ₃ test	865	137.89	53.40	14.66	26.75	2.88	16.53	5.15	1.63	1.23	
TER ₃ 5 g/hL	955	58.12	18.34	0.00	1.56	23.54	3.03	29.65	0.00	0.60	
TER ₃ 10 g/hL	993	30.72	7.18	0.00	1.33	25.11	2.63	30.95	0.00	1.06	
TER ₄ test	1149	221.18	113.18	19.78	33.08	2.01	21.11	3.97	1.47	1.32	
TER ₄ 5 g/hL	1236	50.64	20.86	0.00	3.41	25.73	4.94	33.86	0.00	1.01	
TER ₄ 10 g/hL	1236	51.14	21.90	0.00	3.06	26.75	4.91	33.98	0.00	0.43	
SOL. SINT. test	n.d.	60.83	54.24	30.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
SOL. SINT. 10g/hL	n.d.	26.94	7.04	0.00	0.00	0.00	0.00	12.61	0.00	0.00	

do caffeico la resa è sempre inferiore al 100% mentre, al contrario, la formazione di acido p-cumarico libero supera nettamente quella ottenibile dall'idrolisi dei precursori tartarici, mettendo in luce la sua formazione anche per idrolisi delle antocianine p-cumarate. L'eccesso di acido p-cumarico formato è maggiore anche di quello ricavabile dalle antocianine monomere p-cumarate presenti nel vino, facendo quindi supporre che esso venga liberato anche dai pigmenti antocianici a maggior peso molecolare, a loro volta substrati dell'attività esterasica. In vini derivanti da uve povere di antocianine p-cumarate – come nel caso del *Lambrusco a foglia frastagliata* – tale fatto è secondario, mentre in varietà come il *Teroldego* le antocianine possono essere una fonte primaria di acido p-cumarico. La degradazione delle antocianine p-cumarate è stata confermata nella ripetizione del trattamento enzimatico effettuata sulla soluzione sintetica descritta nei materiali e metodi (fig. 6). In questa soluzione la rimozione delle antocianine è ancora più marcata che rispetto ai vini. La resa in acido p-cumarico (tab. 4) è pari a circa un terzo della quantità di antocianine p-cumarate.

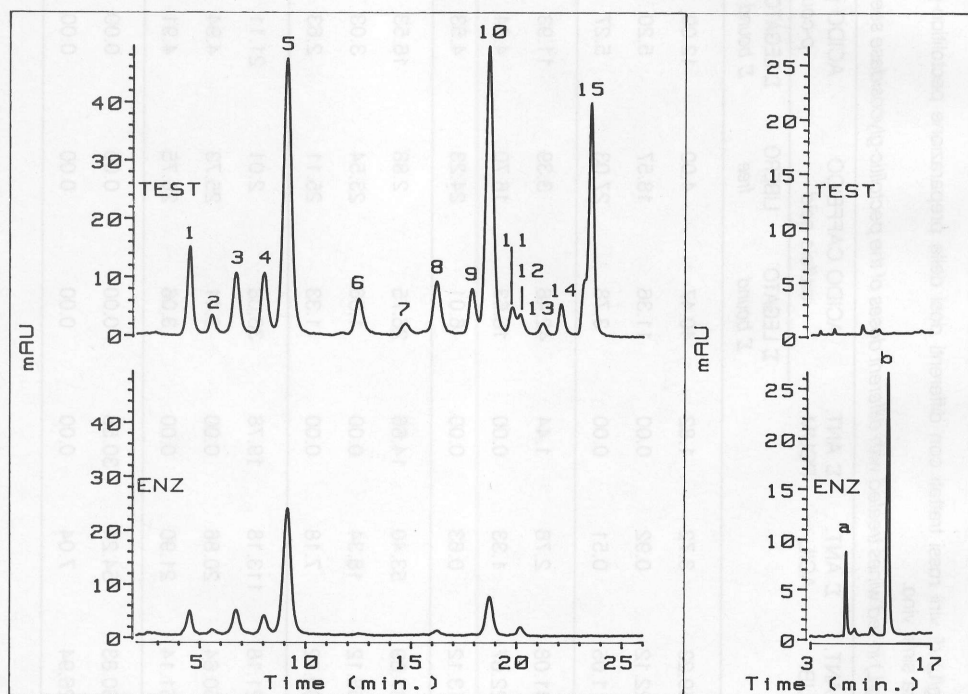


Fig. 6: Analisi degli antociani liberi (sinistra) e degli acidi idrossicinnamici (destra) in una soluzione sintetica simil-vino prima (test) e dopo (enz) enzimaggio (Legenda: 1 = delphinidina-3- monoglucoside; 2 = cianidina-3-monoglucoside; 3 = petunidina-3-monoglucoside; 4 = peonidina-3-monoglucoside; 5 = malvidina-3-monoglucoside; 6,7,8,9,10 = 1,2,3,4,5-acilati; 11,13,14,15 = 1,2,3,4 + 5-p-cumarati, 12 = antociano incognito; a = prodotto di degradazione incognito; b = acido p-cumarico).

Fig. 6: Chromatographic separations of free anthocyanins (left) and hydroxycinnamic acids (right) of a synthetic solution before (test) and after (enz) treatment with enzyme P93 (Legenda: 1 = delphinidine-3 -monoglucoside; 2 = cyanidine-3-monoglucoside; 3 = petunidine-3-monoglucoside; 4 = peonidine-3-monoglucoside; 5 = malvidine-3-monoglucoside; 6,7,8,9,10 = 1,2,3,4,5-aceticester; 11,13,14,15 = 1,2,3,4 + 5-p-coumaric ester; 12 = unknown anthocyanin; a = reaction product, unknown; b = p-coumaric acid).

Sui cromatogrammi relativi alla separazione degli antociani nei vini e nella soluzione sintetica, quest'ultimo riportato in fig. 6, dopo trattamento enzimatico non è stata riscontrata la presenza di prodotti di degradazione delle antocianine, in particolare non vi sono tracce di agliconi. Al contrario, nel cromatogramma degli acidi cinnamici della soluzione sintetica compare anche un picco incognito che è probabilmente un composto intermedio, quantitativamente importante, di degradazione delle antocianine. Esso presenta (fig. 7) uno spettro UV con massimo di assorbanza intorno a 289 nm ed una assorbanza minore a 320 nm, un profilo spettrale analogo a quello dei diidroflavonoli, dei flavanoni e dei diidrocalconi e polarità elevata, vicina a quella dell'acido ferulil-tartarico. Questo composto non era presente nei corrispondenti cromatogrammi dei vini rossi enzimati, per i quali era intercorso un periodo più lungo tra l'enzimaggio e l'analisi. La formazione e l'ulteriore evoluzione di composti con queste caratteristiche, appartenenti alla famiglia dei flavonoidi non antocianici, potrebbe spiegare gli andamenti contrapposti dei parametri antocianici in calo e del dato dei flavonoidi non antocianici in crescita (tab. 4) e merita ulteriori approfondimenti.

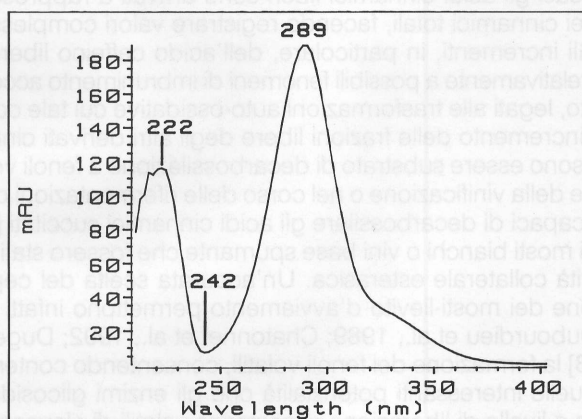


Fig. 7: Spettro ultravioletto del composto "a" di fig. 6.

Fig. 7: UV-spectrum of the compound "a" of fig. 6.

Conclusioni

La casistica di esperienze qui riportate ha evidenziato che alcune delle preparazioni enzimatiche pectolitico-glicosidasiche commerciali e sperimentali utilizzate sono in grado di modificare diversi parametri legati al corredo polifenolico dei vini.

In conseguenza dei trattamenti enzimatici effettuati sui mosti o vini bianchi si è registrata una tendenza, non del tutto spiegabile, all'incremento dell'intensità colorante e dell'indice dei polifenoli totali; tuttavia le variazioni sono apparse, nella maggioranza dei casi, di limitata rilevanza tecnologica.

Di ben maggior rilevanza invece le variazioni indotte nel corredo polifenolico dei vini rossi nei quali i diversi trattamenti enzimatici, qualora eseguiti sui vini, hanno determinato perdite anche consistenti principalmente a carico delle frazioni antocianiche libere.

E' stata evidenziata la degradazione delle antocianine p-cumarate con liberazione di acido p-cumarico. L'esistenza di possibili differenze varietali nella reattività ai trattamenti enzimatici è stata messa in relazione al contenuto di antociani p-cumarati. La presenza di un composto incognito derivato dalla degradazione delle antocianine – con spettro UV comune ai composti flavonoidi aventi un ossigeno chetonico in posizione 4 e con gli atomi di carbonio in posizione 2 e 3 saturi – potrebbe aiutare a spiegare gli incrementi dei flavonoidi non antocianici registrati in alcuni casi.

I trattamenti sui mosti in presenza delle vinacce, a differenza di quanto osservato per i trattamenti sui vini, si sono tradotti in variazioni positive del contenuto antocianico e polifenolico, almeno alla luce dei limitati casi analizzati. A riguardo si può formulare l'ipotesi che la dichiarata attività pectolitica degli enzimi utilizzati – esplicandosi sulle vinacce nel favorire l'estrazione dei pigmenti colorati – sia stata in grado di controbilanciare o sopravanzare le perdite che contemporaneamente o successivamente erano indotte da altre attività enzimatiche collaterali; altra ipotesi è che l'attività a carico degli antociani sia in qualche modo irreversibilmente inibita a livello di mosto.

Variazioni conseguenti ai trattamenti enzimatici si sono registrate anche a carico dei derivati cinnamici con incrementi degli acidi in forma libera, p-cumarico e caffeico in particolare. In diversi casi gli acidi cinnamici liberi sono arrivati a rappresentare oltre il 50 % e fino al 90% dei cinnamici totali, facendo registrare valori complessivi anche superiori ai 60 mg/L. Gli incrementi, in particolare, dell'acido caffeico libero fanno sorgere alcune perplessità relativamente a possibili fenomeni di imbrunimento accentuato nel corso dell'invecchiamento, legati alle trasformazioni auto-ossidative cui tale composto va facilmente incontro. L'incremento delle frazioni libere degli altri derivati cinnamici – che in fermentazione possono essere substrato di decarbossilazione a fenoli volatili – suggerisce l'uso in tale fase della vinificazione o nel corso delle rifermentazioni di lieviti a carattere Pof(–), ossia incapaci di decarbossilare gli acidi cinnamici succitati [Meaden et Taylor, 1991], per quei mosti bianchi o vini base spumante che fossero stati trattati con enzimi ad elevata attività collaterale esterasica. Un'accurata scelta del ceppo di lievito ed una precisa gestione dei mosti-lievito d'avviamento permettono infatti di limitare o comunque gestire [Dubourdieu et al., 1989; Chatonnet et al., 1992; Dugelay et al., 1992; Grando et al., 1993] la formazione dei fenoli volatili, consentendo contemporaneamente il manifestarsi di quelle interessanti potenzialità che gli enzimi glicosidasi hanno mostrato di possedere a livello di liberazione di sostanze volatili di rilevanza sensoriale [Nicolini et al., 1993b]. L'inibizione esercitata dalle frazioni polifenoliche poco polimerizzate dei mosti rossi sulla cinnamato-decarbossilasi dei lieviti [Dubourdieu et al., 1989] – con conseguente insignificante produzione di vinil- fenoli – consente, nella fermentazione in rosso, un uso non problematico delle formulazioni enzimatiche glicosidasiche indagate.

Bibliografia

1. ABBOTT N.A., COOMBE B.G., WILLAMS P.J. (1991). *The contribution of hydrolyzed flavor precursors to quality differences in Shiraz juice and wines: an investigation by sensory descriptive analysis*. Am. J. Enol. Vitic., (42,3): 167-174.
2. ALBAGNAC G. (1975). *La décarboxylation des acides cinnamiques substitués par les levures*. Ann. Technol. Agric., (24,2): 133-141.
3. AURICH M., VERSINI G., DALLA SERRA A. (1987). *Influenza dell'epoca di vendemmia e della macerazione sulle caratteristiche di tipicità dei vini Traminer aromatico dell'Alto Adige*. Proc. Int. Symp. "The aromatic substances in grapes and wines". S. Michele a/A, Italia, 25-27 giugno 1987, Ed. A. Scienza & G. Versini: 223-232.

4. BAYONOVE C., GUNATA Y.Z., SAPIS J.C., BAUMES R.L., DUGELAY I., GRASSIN C. (1992). *Augmentation des arômes dans le vin et utilisation d'enzymes*. Rev. des OEnologues (64): 15-18.
5. CANAL LLAUBERES R.M. (1990). *Utilisation des enzymes dans les procédés d'extraction en œnologie*. Rev. Franc. OEnologie (122): 28-33.
6. CASTIA T., FRANCO M.A., MATTIVI F., MUGGIOLU G., SFERLAZZO G., VERSINI G. (1992). *Characterization of grapes cultivated in Sardinia: chemometric methods applied to the anthocyanic fractions*. Sciences des Aliments, (2): 239-255.
7. CASTINO M., DI STEFANO R. (1976). *Frazionamento degli acidi fenolici dei vini bianchi per gel filtrazione*. Riv. Vitic. Enol., (24): 290-305.
8. CHATONNET P., BARBE C., CANAL-LLAUBERES R.M., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.N. (1992). *Incidences de certaines préparations pectolytiques sur la teneur en phénols volatils des vins blancs*. J. Int. Sc. Vigne Vin., (26,4): 253-269.
9. CHEYNIER V.F., TROUSDALE E.K., SINGLETON V.L., SALGUES M.J., WYLDE R. (1986). *Characterization of 2-S-gluthionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines*. J. Agric. Food Chem., (34): 217-221.
10. CILLIERS J.J.L., SINGLETON V.L. (1990). *Nonenzymic autoxidative reactions of caffeic acid in wine*. Am. J. Enol. Vitic., (41,1): 84-86.
11. CILLIERS J.J.L., SINGLETON V.L. (1991). *Characterization of the products of nonenzymic autoxidative phenolic reactions in a caffeic acid model system*. J. Agric. Food. Chem. (39): 1298-1303.
12. CORDONNIER R.E., GÜNATA Y.Z., BAUMES R.L., BAYONOVE C.L. (1989). *Recherche d'un matériel enzymatique adapté à l'hydrolyse des précurseurs d'arôme de nature glycosidique du raisin*. Conn. Vigne Vin (23, 1): 7-23.
13. DI STEFANO R., GARCIA-MORUNO E. (1986). *Composti fenolici dei vini: gli acidi fenolici*. Vini d'Italia (1): 9-18.
14. DI STEFANO R., GUIDONI S. (1989). *La determinazione dei polifenoli totali nei mosti e nei vini*. Vignevini, (1/2): 47-52.
15. DI STEFANO R., CRAVERO M.C., GENTILINI N. (1989). *Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini*. L'Enotecnico, (25,5): 83-89.
16. DI STEFANO R., CRAVERO M.C. (1989). *I composti fenolici e la natura del colore dei vini rossi*. L'Enotecnico, (25,10): 81-87.
17. DUBOURDIEU D., DARRIET P., CHATONNET P., BOIDRON J.N. (1989). *Intervention de systèmes enzymatiques de Saccharomyces cerevisiae sur certains précurseurs d'arômes du raisin*. Actualités œnologiques 89, Proc. "4^e Symp. Int. d'OEnologie", Bordeaux, June 15-17, 1989, ed. P. Ribereau-Gayon & A. Lonvaud: 151-159.
18. DUGELAY I., GUNATA Z., SAPIS J. C., BAUMES R., BAYONOVE C. (1992). *Formation of volatile phenols from cinnamic precursors during winemaking: the role of cinnamoyl esterase from commercial enzymic products*. Int. Symp. "Flavour precursors. Analysis, generation, biotechnology". Würzburg, Germany, September 30-October 2, 1992.
19. GLORIES Y. (1984). *La couleur des vins rouges. 2^a partie. Mesure, origine et interpretation*. Conn. Vigne Vin, (18,4): 253-271.
20. GÓMEZ-CORDOVES C., GIL C. (1984). *Niveaux des acides benzoïques et cinnamiques dans les vins rouges varietales espagnoles*. Bull. Liaison Groupe Polyphenols, (12): 417-420.
21. GRANDO M.S., VERSINI G., NICOLINI G., MATTIVI F. (1993). *Selective use of wine yeast strains having different volatile phenols production*. Vitis, (32): 43-50.
22. GROßMANN M., RAPP A., RIETH W. (1987). *Enzymatische Freisetzung gebundener Aromastoffe in Wein*. Dtsch. Lebensm.-Rdsch., (83,1): 7-12.
23. GROßMANN M., RAPP A., (1988). *Steigerung des sortentypischen Weinbuketts nach Enzymbehandlung*. Dtsch. Lebensm.-Rdsch., (84,2): 35-37.
24. GROßMANN M., SUKRAN I., RAPP A. (1990). *Einfluß kellertechnischer Maßnahmen auf das Sortebukett*. Weinwirtschaft Technik (8): 13-16.
25. GUNATA Z., BITTEUR S., BRILLOUET J.M., BAYONOVE C., CORDONNIER R. (1989). *Hydrolyse enzymatique des glycosides terpeniques précurseurs d'arôme du raisin*. Actualités œnologiques 89, Proc. "4^e Symp. Int. d'OEnologie", Bordeaux, June 15-17, 1989, ed. P. Ribereau-Gayon & A. Lonvaud: 146-150.
26. GUNATA Z., DUGELAY I., SAPIS J.C., BAYONOVE C. (1990). *Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification: libération de l'arome a partir de précurseurs glycosidiques*. J. Int. Sciences Vigne Vin, (24,3): 133-144.

27. MATTIVI F., NICOLINI G., SANCHEZ C. (1991). *Confronto tra il contenuto polifenolico di vini Marzemino, Pinot nero e Sangiovese dell'annata 1989*. Riv. Vitic. Enol., (44,1): 39-52.
28. MEADEN P.G., TAYLOR N.R. (1991). *Cloning of a yeast gene which causes phenolic off-flavours in beer*. J. Inst. Brew., (97): 353-357.
29. NICOLINI G., MATTIVI F., DALLA SERRA A. (1991). *Iperossigenazione dei mosti: conseguenze analitiche e sensoriali su vini della vendemmia 1989*. Riv. Vitic. Enol., (44,3): 45-56.
30. NICOLINI G., GUNATA Y.Z., VERSINI G., DUGELAY I., MATTIVI F. (1993A). *Use of glycosidase enzymes in musts: effects on the chemical and sensory characters of the wines*. Proc. Symp. Int. "Connaissance aromatique des cépages et qualité des vins". Montpellier, France, Febr. 9-10, 1993 (in press).
31. NICOLINI G., VERSINI G., DALLA SERRA A. (1993B). *Enzimi pectolitico-glicosidasici esogeni in mosti e vini: aspetti analitici e sensoriali*. L'Enotecnico, (10): 55-68.
32. PIERGIOVANNI L., VOLONTERIO G. (1980). *Tecniche cromatografiche nello studio della frazione antocianica delle uve*. Riv. Vitic. Enol., (6): 3-22.
33. SOMERS T.C., VERETTE E., POCOCK K.F. (1987). *Hydroxycinnamate esters of Vitis vinifera: changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis*. J. Sci. Food Agric., (40): 67-78.
34. VERSINI G. (1985). *Sull'aroma del vino "Traminer aromatico" o "Gewürztraminer"*. Vignevini, (12,1-2): 57-65.